

Leitlinie für die Führung und Einrichtung eines Labors für die Durchführung -Assistierter Reproduktionstechnologien beim Menschen (ART-Labor) innerhalb einer reproduktionsmedizinischen Versorgungseinrichtung der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen (AGRBM)

Die Leitlinie tritt ab dem 21.05.2021 in Kraft und ersetzt die Leitlinie vom 25.04.2008.

Die „Leitlinie für die Führung und Einrichtung eines Labors für die Durchführung Assistierter Reproduktionstechnologien beim Menschen (ART-Labor)“ der AGRBM trat ursprünglich am 27.04.2004 in Kraft und wurde am 25.04.2008 aktualisiert.

Die aktuelle Leitlinie wurde auf der Grundlage der EU-Richtlinie 2004/23/EG und ihrer beiden Durchführungsrichtlinien (2006/17/EG, 2006/86/EG), sowie des Arzneimittelgesetzes (AMG, Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln) und seiner dazu erlassenen Rechtsverordnungen (AMWHV, TPG-GewV) überarbeitet.

Sie trat am 21.05.2021 in Kraft und ersetzt die bisherige Leitlinie vom 25.04.2008. Die Überarbeitung wurde vom Arbeitskreis „Qualitätsmanagement“ der AGRBM vorgenommen. Die vorliegende Leitlinie steht im Kontext zur „Leitlinie zum verantwortlichen Arbeiten im ART-Labor“ der AGRBM, die im Konsens mit dem Bundesverband Reproduktionsmedizinischer Zentren (BRZ) verabschiedet wurde.

Ziel der vorliegenden Leitlinie ist es, Empfehlungen für die Führung und Einrichtung eines Labors für assistierte Reproduktionstechniken unter dem Dach einer reproduktionsmedizinischen Versorgungseinrichtung auszusprechen, damit die Qualität, Vitalität und Sicherheit der Keimzellen und Embryonen während der In-vitro-Phase gesichert ist. Dies umfasst die Erfüllung der gesetzlichen Anforderungen an die Dokumentation, Validierung und Qualifizierung der Arbeitsprozesse und der Überprüfung der daraus resultierenden Arbeitsergebnisse. Dazu sind eindeutige Beschreibungen der Arbeitsprozesse, Festlegung der Verantwortlichkeiten, ausreichende Personalbesetzung und adäquate Geräteausstattung erforderlich. Vorgaben zur Qualifizierung des akademischen Laborpersonals sind der Fort- und Weiterbildungsordnung der AGRBM zu entnehmen. Die Leitlinie orientiert sich an den Publikationen der Association of Clinical Embryologists (2012) [1], der ASRM (2014) [2] und der ESHRE (2015) [3].

Die Leitlinie ist entsprechend dem wissenschaftlichen und methodischen Kenntnisstand und in Anpassung an gesetzliche und berufsrechtliche Vorgaben regelmäßig zu überprüfen und zu aktualisieren. Im Hinblick auf den im Embryonenschutzgesetz normierten Arztvorbehalt und die berufsrechtlichen Regelungen der beteiligten Ärzte durch ärztekammerspezifische „Richtlinien zur Durchführung der Assistierten Reproduktion“ [4] werden Änderungen dieser Leitlinie in Abstimmung mit dem BRZ vorgenommen.

Autoren der Leitlinie aus dem Arbeitskreis Qualitätsmanagement

Dr. rer. nat. Dagmar Gutknecht

Dipl. Biol. Verona Blumenauer

Dr. sc. hum. Brigitte Hauff

Dr. rer. nat. Petra Klusmann

Dr. rer. nat. Tom Trapphoff

Dr. agr. Dorothee Weiss

Vorstand der AGRBM

Dr. rer. nat. Verena Nordhoff (1. Vorsitzende)

Dr. rer. nat. Alain Wunsch

Dr. rer. nat. Melanie Rickert-Föhring

Dipl. Biol. Werner Hoppenstedt

Dipl. Biol. Claudia Grewenig

Vorstand des BRZ

PD Dr. med. Ulrich A. Knuth (Komm. Vorsitzender)

Dr. med. Thilo Schill (Schriftführer)

1. Organisation und Verwaltung

1.1. Organisation und Verantwortlichkeiten

1.2. Aufgabenspektrum des ART-Labors

1.3. Qualitätsmanagement

1.3.1. Dokumentation

1.3.2. Rückverfolgbarkeit

1.3.3. Datenschutz

1.3.4. Meldepflichten

2. Personelle Besetzung des ART--Labors

2.1. Personalbedarf

2.2. Laborleitung und Vertretung

2.3. Weiteres Laborpersonal

2.4. Einarbeitung des Laborpersonals

2.5. Schulung und Fortbildung

2.6. Verantwortlichkeiten, Rechte und Pflichten der Labormitarbeiter

2.7. Orientierungshilfe zum Personalbedarf

3. Ausstattung und Gerätschaften

3.1. Räumliche Ausstattung

3.1.1. Raumlufte

3.1.2. Anwendung der Ausnahme-regeln für die Anforderungen an die Umgebung gem. AMWHV §36 Abs.2

3.1.3. Andrologischer Bereich

3.1.4. Bereich für die In-vitro--Kultur

3.1.5. Sonstige Räume

3.2. Gerätetechnische Ausstattung

3.2.1. Andrologischer Bereich

3.2.2. Bereich für die In-vitro--Kultur

3.2.3. Bereich für die Kryolagerung

3.2.4. Gasversorgung

3.2.5. Administration- ART--Labor Büro

3.3. Kryolagerung von Keimzellen, Vorkernstadien und Embryonen

3.4. Kultivierungsmedien und Materialien

4. Hygiene und Reinigung

5. Literaturverzeichnis

1. Organisation und Verwaltung

1.1. Organisation und Verantwortlichkeiten

Das Labor für assistierte Reproduktionstechniken (ART-Labor) ist Teil einer Entnahmeeinrichtung für menschliche Keimzellen. Im ART-Labor findet die In-vitro-Kultur und Lagerung humaner Gameten und Embryonen statt.

Die Keimzellen der Frau (Oozyten) werden durch einen Reproduktionsmediziner gewonnen und unter seiner Verantwortlichkeit an das ART-Labor zur weiteren Be- und Verarbeitung übergeben.

Das ART-Labor muss unter qualifizierter Führung stehen. In die Verantwortlichkeit der Leitung gehören fachliche, organisatorische, Verwaltungs-, Schulungs- und Fortbildungsaufgaben in Abstimmung mit der medizinischen Leitung. Die Verantwortung und die Zuständigkeit für die

Durchführung der Methoden im ART-Labor sowie Aufgaben in der Labororganisation und dem Qualitätsmanagement müssen eindeutig festgelegt und nachvollziehbar dokumentiert sein.

Eine Schnittstellenbeschreibung zu den klinischen Struktureinheiten sollte vorliegen (e.g. Organigramm). Es sollten regelmäßige Besprechungen zwischen der Laborleitung und der medizinischen Leitung (behandelnde Ärzte) durchgeführt werden.

1.2. Aufgabenspektrum des ART-Labors

Diagnostische/Therapeutische Aufbereitung von Ejakulat und Hodengewebe

Isolierung von Eizellen aus Follikelpunktat

In-vitro-Fertilisation (IVF) und Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

Kultivierung, Beurteilung, Kryokonservierung und Auftauen von Keimzellen, Hodengewebe, Vorkernstadien und Embryonen

Organisation der Lagerung und der Durchführung des Transports kryokonservierter Proben

Mitwirkung beim Embryotransfer

Dokumentation der In-vitro-Behandlung

Prüfung, Beschaffung und Lagerung von Materialien für das ART-Labor

Verantwortung für die Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte

Aufbau und Erhaltung des Qualitätsmanagements im Labor

Ein Leistungsverzeichnis des ART-Labors für die durchzuführenden Methoden sollte vorliegen. Für alle angewandten Labormethoden müssen SOPs (Standard Operating Procedure = Standardarbeitsanweisung) vorhanden sein. Alle Labormitarbeiter müssen nachweislich nach diesen SOPs geschult sein und nach diesen vorgehen.

Bei der Entgegennahme, Bearbeitung und Herausgabe von Materialien und Proben von Patienten muss die eindeutige und verwechslungssichere Zuordnung während der gesamten In-vitro-Phase jederzeit gewährleistet sein. Maßnahmen, die dies sicherstellen, sind in der jeweiligen SOP zu beschreiben.

Die Reinigung/Desinfektion der Geräte und Arbeitsplätze sowie der Laborräume ist zu dokumentieren (vgl. Leitlinie zum verantwortlichen Arbeiten im ART--Labor).

Zur adäquaten Bearbeitung der im ART-Labor anfallenden Aufgaben ist ein bedarfsgerechter Personalbestand zu ermitteln und vorzuhalten (siehe Punkt 2: Personalbedarf).

1.3. Qualitätsmanagement

Es ist ein Qualitätsmanagementsystem gemäß der „Guten Fachlichen Praxis“ zu führen.

Maßnahmen für die kontinuierliche Qualitätssicherung und Datenauswertung sind gemäß Art und Umfang der durchgeführten Tätigkeiten zu treffen. Eine regelmäßige Aus- und Bewertung der durchgeführten Methoden – wo angebracht – soll durch die durchführenden Personen und Gesamtverantwortlichen stattfinden.

Für die frühe Erkennung struktureller Prozessfehler ist die Festlegung Zen-trums-spezifischer „Key Performance Indicators“ (KPIs) sinnvoll [5]. Ebenfalls sollten Untergrenzen definiert werden, an denen die Suche nach Fehlerquellen erfolgen sollte. Die Festlegung von sogenannten KPIs zur Validierung der Be- und Verarbeitungsverfahren (§36 Abs. 6 der AMWHV) sind hingegen nicht geeignet, die Ergebnisqualität darzustellen, da diese maßgeblich von individuellen Faktoren des jeweiligen Paares (Alter der Frau und ihrem Körpergewicht, Eizellqualität, Anzahl der für eine Befruchtung zur Verfügung stehenden Eizellen, Spermaqualität, Befruchtungsfähigkeit der Gameten etc.) beeinflusst werden. Die Sicherung der Ergebnisqualität obliegt den Landesärztekammern (Richtlinie der BÄK vom 11.05.2018 [6]).

Qualitätsziele des ART-Labors sollten schriftlich festgehalten werden. Eine Überprüfung der angestrebten Ziele sollte z. B. im Rahmen eines internen Audits (Teilnehmer: Laborleitung, Stellvertreter des Laborpersonals, Ärztliche Leitung, Stellvertreter des ärztlichen Personals) regelmäßig durchgeführt werden. Im Rahmen des Qualitätsmanagements muss ein Risikomanagement implementiert sein.

Datenblätter und Zertifikate aller qualitätsrelevanten Materialien sind gemäß gesetzlicher Vorschriften zu archivieren.

Der Nachweis über Kalibrierungen, Wartungen und Funktionsprüfungen von Geräten ist zu führen und ebenfalls gemäß gesetzlichen Vorschriften aufzubewahren.

1.3.1. Dokumentation

Die Laborarbeiten sollen prozessbezogen mit Formblättern bzw. elektronischen Dokumentationssystemen dokumentiert werden. Einträge müssen über die gesamte gesetzlich vorgeschriebene Aufbewahrungsfrist lesbar sein.

Die Identität der ausführenden Person ist prozessbezogen zu dokumentieren. Die gesetzlichen Vorgaben zu Datum- und Zeitangaben müssen erfüllt werden.

1.3.2. Rückverfolgbarkeit

Eine lückenlose Rückverfolgung der Keimzellen und Embryonen muss gegeben sein. Die Freigabe der Keimzellen zur Be- und Verarbeitung oder zur Lagerung muss den gesetzlichen Bestimmungen entsprechen.

Datenaufzeichnungen müssen während des vorgeschriebenen Aufbewahrungs-zeitraums auffindbar und eindeutig zurückverfolgbar sein.

1.3.3. Datenschutz

Der Datenschutz muss unter Beachtung der aktuellen Anforderungen der Datenschutzgesetzgebung erfolgen. Dabei werden die Maßnahmen zum Datenschutzmanagement des ART-Labors entsprechend dokumentiert.

Die Erfüllung gesetzlicher Aufbewahrungspflichten (Art und Dauer) ist zu berücksichtigen, Archivierungs- sowie Löschfristen sind zu definieren. Bei elektronischen Aufzeichnungen ist über Datenänderungen eine Historie mitzuführen, damit nachweisbar ist, wann, und durch welche Person, Änderungen vorgenommen worden sind.

Die regelmäßige Sicherung und Aufbewahrung aller relevanten und persönlichen Daten muss rechtskonform erfolgen.

1.3.4. Meldepflichten

Gesetzliche Vorgaben zu Meldepflichten an das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) als Prüfbehörde sind entsprechend einzuhalten: Dazu gehören die Meldung gem. §8d TPG sowie die Meldung schwerwiegender Zwischenfälle gemäß § 63i Abs 6,7 AMG.

2. Personelle Besetzung des ART-Labors

2.1. Personalbedarf

Die adäquate Erfüllung des Aufgabenspektrums (siehe Punkt 1.2.) erfordert eine bedarfsgerechte personelle Besetzung des ART-Labors. Der Personalbedarf richtet sich dabei im Besonderen nach der jährlichen Anzahl der Behandlungszyklen (Punktions- und Auftauzyklen), nach dem Zeitbedarf der einzelnen Behandlungsschritte, der Anzahl der jährlichen Arbeitsstunden und der Umsetzung des Qualitätsmanagements gemäß der „Guten Fachlichen Praxis“. Bei der Ermittlung des Personalbedarfs muss der Bedarf für Wochenend- und Feiertagsdienste, deren Kompensation und auch Vertretungsregelungen für den gesetzlich zustehenden Urlaub berücksichtigt werden.

Tätigkeiten über die unter Punkt 1.2. genannte Aufgaben hinaus, wie zum Beispiel die Durchführung von intra-uteriner Insemination (IUI), pICSI, TESE-ICSI, morphokinetische Beurteilung, Fertiprotekt, Social Freezing, PKD und Präimplantationsdiagnostik, begründen grundsätzlich einen zusätzlichen Personalbedarf.

Angestellte Labormitarbeiter müssen über einen Arbeitsvertrag mit eindeutiger Funktionsbeschreibung verfügen. Arbeitsrechtliche Vorgaben sind einzuhalten.

2.2. Laborleitung und Vertretung

Die Laborleitung soll mindestens folgende Qualifikationen besitzen:

Master of Science oder Diplom oder einen vergleichbaren Hochschulabschluss in einem biowissenschaftlichen Fach oder der Human- oder Veterinär-Medizin,

Fachanerkennung „Reproduktionsbiologe“ der AGRBM oder eine vergleichbare Fachanerkennung, die kontinuierliche Erfüllung der Fortbildungsanforderungen der AGRBM oder einer vergleichbaren Fachgesellschaft im Bereich der Reproduktionsbiologie des Menschen,

nachweislich mindestens 6 Jahre (nachfolgend auf den Hochschulabschluss) dokumentierte, praktische und theoretische Erfahrung in der klinischen Reproduktionsbiologie.

Die Vertretung der Laborleitung sollte mindestens einen Master of Science oder ein Diplom oder einen vergleichbaren Hochschulabschluss in einem biowissenschaftlichen Fach oder der Human- oder Veterinär-Medizin besitzen.

Die Vertretung muss geregelt und dokumentiert sein.

2.3. Weiteres Laborpersonal

Das weitere Laborpersonal verfügt über einen Berufsabschluss mit bio- oder labormedizinischem Bezug.

2.4. Einarbeitung des Laborpersonals

Die Einarbeitung des Laborpersonals erfolgt nach festgelegten internen Vorgaben und unter Supervision erfahrener Labormitarbeiter anhand eines Einarbeitungsplans. Der Einarbeitungserfolg und die Freigabe zur Tätigkeit sind zu dokumentieren. Die Freigabe für das selbständige Arbeiten erfolgt durch die Laborleitung oder durch eine dazu autorisierte Person.

Die qualifizierte Durchführung einzelner Labormethoden sollte anhand geeigneter KPIs individuell ausgewertet und dokumentiert werden.

2.5. Schulung und Fortbildung

Die Qualifikation und fachliche Kompetenz der Mitarbeiter sollte durch die Teilnahme an Schulungen und Fortbildungen sichergestellt werden. Dazu sollte ein Schulungsplan erstellt werden. Erfolgte Schulungen und Fortbildungen sind zu dokumentieren.

2.6. Verantwortlichkeiten, Rechte und Pflichten der Labormitarbeiter

Die Festlegung der Verantwortlichkeiten innerhalb des ART-Labors muss schriftlich erfolgen. Die Rechte, Pflichten und Verantwortlichkeiten der Labormitarbeiter sind in einer Stellenbeschreibung -dokumentiert. Ferner kann eine detailliertere Verteilung der Verantwortlichkeiten z. B. in einer Verantwortlichkeiten--Matrix dargestellt werden.

2.7. Orientierungshilfe zum Personalbedarf

Zur adäquaten Erfüllung der im ART--Labor anfallenden Aufgaben kann der unten genannte Personalbedarf als Orientierungshilfe dienen (zum Vergleich siehe auch die Veröffentlichung der ASRM (2008) [7] und Keck et al. 2005) [8].

Die genannten Zykluszahlen beziehen sich ausschließlich auf die Durchführung von IVF-, ICSI- und Kryo-Auftau-Zyklen, gemäß Punkt 1.2 Aufgabenspektrum des ART-Labors in dieser Leitlinie.

Anzahl IVF/ICSI/Kryo-Zyklen und Anzahl Mitarbeiter

bis 300: 3

301 bis 600: 4

601 bis 900: 5

901 bis 1200: 6

1201 bis 1500: 7

1500 bis 1800: 8

1801 bis 2100: 9

Auch bei einer Zyklenzahl von bis zu 300 ist es sinnvoll, mindestens 3 Mitarbeiter (auch in Teilzeitanstellung möglich) anzustellen, vor allem, um im Fall von Krankheit oder Urlaub die anfallenden Aufgaben adäquat ausführen zu können.

Mit steigender Zykluszahl pro Jahr nimmt der Personalbedarf zu: Pro weitere 300 Zyklen/Jahr wird eine weitere Stelle (Mitarbeiter) benötigt (die ASRM empfiehlt einen weiteren Mitarbeiter pro 200 Zyklen).

Ab 300 Zyklen/Jahr erfordert die Position des Laborleiters in der Regel eine Vollzeitstellung.

3. Ausstattung und Gerätschaften

3.1. Räumliche Ausstattung

Die Räumlichkeiten des ART-Labors sollen gemäß AMWHV für den Zweck der Be- und Verarbeitung, Kryokonservierung und Lagerung menschlicher Keimzellen und Embryonen geeignet sein.

Die Räumlichkeiten dürfen nur autorisiertem Personal zugänglich sein und sind gegen unbefugten Zutritt zu sichern.

Es muss ausreichend Arbeitsfläche in den verschiedenen Arbeitsbereichen und Bewegungsraum zwischen den Bereichen vorhanden sein, um ein sicheres Arbeiten der Labormitarbeiter zu ermöglichen. Die Wege zwischen den Arbeitsplätzen und Inkubatoren sollten kurz sein, um Temperaturschwankungen in den Kulturen zu minimieren. Ausreichende Stellflächen für Geräte und Lagermöglichkeiten für Materialien werden benötigt.

Die Arbeitsflächen müssen leicht zu reinigen sein und von nicht benötigten Gegenständen freigehalten werden.

Separate Arbeitsbereiche für Labor- und Büroarbeiten sind erforderlich. Die Lagerung größerer Vorratsmengen sollte außerhalb des ART-Labors stattfinden.

Zur Gewährleistung der Durchführbarkeit aller angebotenen Labormethoden muss eine ausreichende Anzahl geeigneter Geräte zur Verfügung stehen.

Für alle eingesetzten Geräte muss eine Bedienungsanleitung im ART-Labor vorhanden sein. Die Wartung/Funktionskontrolle der Geräte muss regelmäßig erfolgen und ist zu dokumentieren. Defekte Geräte müssen schnellstmöglich repariert bzw. ersetzt werden.

Grundkenntnisse zur Fehlerbeseitigung an Geräten sollten alle Labormitarbeiter besitzen.

Störfälle der Geräte sowie deren Behebung sind zu dokumentieren.

Geräte sind nach Erstinstallation und nach Wartung oder Reparatur auf ihre Funktionen zu überprüfen und werden von der Laborleitung zur Inbetriebnahme freigegeben.

Eine tägliche Inbetriebnahme-Routine der Geräte ist empfehlenswert, um funktionseingeschränkte bzw. defekte Geräte vor Arbeitsbeginn zu erfassen.

3.1.1. Raumluft

Die Anforderung der Einhaltung der Raumluftklasse D gemäß GMP-Leitfaden Annex 1 im ART-Labor muss gewährleistet sein. Die Temperatur im ART-Labor muss kontrollierbar sein, so dass die Funktionsfähigkeit z. B. von Inkubatoren nicht beeinträchtigt wird.

3.1.2. Anwendung der Ausnahme-regeln für die Anforderungen an die Umgebung gem. AMWHV §36 Abs. 2

§36 Abs. 2 AMWHV fordert eine Umgebung der Raumluftklasse A in einer Umgebung der Klasse D, gemäß GMP-Leitfaden Annex 1 für die Be- und Verarbeitung von Keimzellen. Die dort genannten Ausnahmeregeln für diese Anforderung finden Anwendung bei der In-vitro-Kultur von Keimzellen und Embryonen. Von den Anforderungen an die Umgebung kann abgewichen werden wenn nachgewiesen wird, dass die Exposition gegenüber einer Umgebung der Klasse A schädliche Auswirkungen auf die erforderlichen Eigenschaften der Gewebe hat oder, dass mit der Art und Weise der Verwendung der Gewebe beim Empfänger oder bei der Empfängerin ein erheblich geringeres Risiko der Übertragung einer Bakterien- oder Pilzinfektion auf den Empfänger oder die Empfängerin einhergeht als bei der Gewebetransplantation. Diesbezüglich wird auf den Kommentar von Baukloh und Hilland (2005) [4] und auf die Richtlinie der BÄK zur Entnahme und Übertragung von menschlichen Keimzellen im Rahmen der assistierten Reproduktion [6] verwiesen.

3.1.2.1. Nachweis, dass die Exposition gegenüber einer Umgebung der Klasse A schädliche Auswirkungen auf die erforderlichen Eigenschaften der Gewebe hat (Ausnahmeregel AMWHV §36 Abs. 2b)

Risiko: Die hohen Luftstromgeschwindigkeiten der Raumluftklasse A führen zur Verdunstung der Kulturmedien und damit zur Schädigung der Keimzellen und Embryonen durch suboptimale Kulturbedingungen.

Die Anforderung, menschliche Gameten unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen der Klasse A zu bearbeiten, kann deren Qualität und Sicherheit gefährden.

Ein Teil der Bearbeitungsschritte kann nicht unter einer der Verdunstung entgegenwirkenden Ölschicht stattfinden, dies sind unter anderem die Isolation der Eizellen und die Kryokonservierung. Hierbei führen die hohen Luftstromgeschwindigkeiten der Raumklasse A zu einer schnellen Abkühlung (durch Verdunstung) der Follikelaspirate und Kulturmedien.

Weiterhin stellen die sehr hohen Luftstromgeschwindigkeiten der Raumluftklasse A bei der Schalen- und Mediovorbereitung ein großes Risiko dar: Das Medium verdunstet sehr schnell, dies kann zu Änderungen der Osmolalität im Medium führen [9, 10]. Daher ist es wichtig, die Verdunstung der Kulturmedien gering zu halten und die Luftstromgeschwindigkeit zu verringern. Zum anderen stellen die Bedingungen der Klasse A ein großes Risiko für die Entwicklungsfähigkeit und Vitalität der entstehenden Embryonen dar. Keimzellen und frühe Teilungsstadien werden in kleinen Mediovolumina kultiviert, die, selbst bei Überschichtung mit Öl, unter kontinuierlichem Air-Flow verdunsten; dies führt zu einer erhöhten Osmolalität im Medium, einem ansteigenden extrazellulären pH-Wert und einem Temperaturabfall [9–14].

Die Folgen der Medienverdunstung stellen ein grundsätzliches Risiko für die Qualität und Sicherheit der Keimzellen und frühen Teilungsstadien dar [9, 14]. Ferner führt z. B. eine Abnahme der Temperatur zu Störungen der meiotischen Spindel [15] und damit potentiell zu De-novo-Fehlverteilungen der Chromosomen (Aneuploidien) [16].

3.1.2.2. Nachweis der Inaktivierung von Keimen (Ausnahmeregel AMWHV §36 Abs. 2 Punkt a.)

Risiko: Verkeimung der In-vitro-Kulturen durch das Einbringen von Keimen aus Follikelpunktat und Ejakulat.

Die Gewinnung menschlicher Keimzellen kann nicht keimfrei, sondern nur keimreduzierend erfolgen, da schon die Ausgangszellen nicht unter keimfreien Bedingungen gewonnen werden können. Daher werden Kulturmedien verwendet, deren Antibiotika-Zusatz die Keime inaktiviert.

Eizellen werden durch transvaginale Follikelpunktion gewonnen. Eine vorhergehende Desinfektion der Vagina der Spenderin birgt ein sehr hohes Risiko für die Schädigung der Keimzellen und wird daher von der Richtlinie der Bundesärztekammer [6] auf deutscher und auch auf europäischer Ebene durch die Richtlinie der European Society of Human Reproduction and Embryology [17] ausdrücklich abgelehnt.

Die Keimzellen des Mannes (Spermien) werden in den meisten Fällen durch orthograde Ejakulation gewonnen. Selbst bei Durchführung geeigneter Hygienemaßnahmen vor der Gewinnung sind die männlichen Keimzellen immer mit den Keimen der normalen/physiologischen Standortflora des Mannes kontaminiert [18, 19].

3.1.2.3. Nachweis, dass mit der Art und Weise der Verwendung der Gewebe bei der Empfängerin ein erheblich geringeres Risiko der Übertragung einer Bakterien- oder Pilzinfektion auf die Empfängerin einhergeht als bei der Gewebetransplantation (Ausnahmeregelung AMWH §36 Abs. 2c)

Risiko 1: Verkeimung der In-vitro-Kulturen

Nach der Gewinnung der Keimzellen und der anschließenden Embryonen-kultur erfolgen mehrere Waschschriffe, durch die Verdünnungseffekte kommt es zur Reduktion der Spenderkeime. Die wiederholten Waschschriffe sind somit eine effektive Maßnahme, um einer Infektion der Kulturen entgegen zu wirken [20]. Zusätzlich enthalten die Kulturmedien Antibiotika, die vorhandene Keime inaktivieren. Zudem fungiert die Überschriffung mit sterilem Zellkulturöl als Barriere zur Umgebungsraumluft. Bei antiseptischem Arbeiten mit sterilen Einmalmaterialien stellt die Umgebungsraumluft ein vernachlässigbares Risiko für die De-novo-Infektion, bzw. Kontamination der Kulturen dar.

Risiko 2: Eintrag von Keimen in den Uterus durch transvaginalen-transzervikalen Transfer der Embryonen

Der Uterus der Frau ist nicht keimfrei [21] und mit dem transzervikalen Transfer der Embryonen ist die Kontamination des Uterus mit vaginalen Keimen unvermeidbar. Jedoch ist die immunologische Kompetenz des Uterus auf den Eintrag von Kontaminationen eingerichtet [21].

Bei den Empfängerinnen handelt es sich um gesunde Frauen, deren Immunsystem, im Gegensatz zu Empfängerinnen von z. B. Gewebetransplantationen, nicht supprimiert wurde. Die Daten, u. a. auch die des Deutschen IVF-Registers (D·I·R), zeigen keine Zunahme von Infektionen bei ART-Patientinnen, auch nicht nach IUI, bei der aufbereitetes Ejakulat ohne vorherige Keiminaktivierung in den Uterus inseminiert wird.

Die transzervikale Übertragung an sich stellt ein unvermeidbares Risiko für den Eintrag von Bakterien und Pilzen in den Uterus dar. Dies führt jedoch nicht zu -einem erhöhten Infektionsrisiko. Es wurde eindeutig gezeigt, dass mit der Art und Weise der Verwendung der aufbereiteten Gewebe für die

Empfängerin ein erheblich geringeres Risiko der Übertragung einer Bakterien- oder Pilzinfektion einhergeht als bei der Gewebetransplantation.

Der potentielle Eintrag von Keimen durch einen Embryo ist aufgrund der oben zitierten Literatur und der Daten des D·I·R vernachlässigbar.

3.1.2.4. Standpunkte der AGRBM zur Anwendung der Ausnahmeregeln zur Anforderung der Raumlufthklasse A

Die AGRBM sieht daher die Nachweise gem. AMWHV §36 Abs 2 b und c erbracht. Somit kann von der Anforderung der Einhaltung der Raumlufthklasse A bei der Be- und Verarbeitung menschlicher Keimzellen und Embryonen abgewichen werden und die Be- und Verarbeitung in Umgebung D erfolgen.

3.1.3. Andrologischer Bereich

Im andrologischen Bereich werden Arbeitsbereiche für die Durchführung der folgenden Tätigkeiten vorgesehen:

Aufarbeitung von Spermaproben für die In-vitro-Kultur, Kryokonservierung und ggfs. Diagnostik, Kryokonservierung von Ejakulat, Nebenhodenpunktat und Hodenbiopsaten (Geräte für die Kryokonservierung können sowohl in den Räumlichkeiten des Kryolagers als auch im ART-Labor platziert werden),

Sollten Färbungen unter Verwendung von Chemikalien durchgeführt werden, dann sollten diese außerhalb des Bereichs für die In-vitro-Kultur ausgeführt werden.

3.1.4. Bereich für die In-vitro-Kultur

Der Bereich für die In-vitro-Kultur sollte sich in räumlicher Nähe zum Entnahmeraum für Eizellen bzw. dem Embryotransfer-Raum befinden. Beim Transport der Punktatflüssigkeiten muss die Wärmestabilität gewährleistet sein. Eine zügige Weiterverarbeitung der Keimzellen muss ebenfalls gesichert sein.

Die Temperaturstabilität der In-vitro-Kulturen sollten durch kurze Transportwege gewährleistet werden, dazu sollten die Inkubatoren von allen Arbeitsplätzen gut zugänglich sein.

Im Bereich für die In-vitro-Kultur müssen Arbeitsbereiche für die folgenden Tätigkeiten vorgehalten werden:

Vorbereitung zur Kultivierung

Untersuchung der Punktatflüssigkeiten und Überführung der Eizellen in die Kulturschalen

Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

In-vitro-Fertilisation

Beurteilung von Eizellen/Vorkernstadien/Embryonen

Kryokonservierung bzw. Vitrifikation

3.1.5. Sonstige Räume

Für die administrative Abwicklung der ART-Therapiezyklen (Dokumentation, Bestell- und Lieferwesen etc.) sollten separate Räume zur Verfügung stehen. Das Büro der Laborleitung sollte sich in der Nähe des ART-Labors befinden.

3.2. Gerätetechnische Ausstattung

Zur Durchführbarkeit der angebotenen Labormethoden muss, gemäß dem Arbeitsaufkommen, eine ausreichende gerätetechnische Ausstattung vorhanden sein.

3.2.1. Andrologischer Bereich

Gegenstand und Bemerkungen

Phasenkontrastmikroskop: Mit geeigneten Objektiven zur Bestimmung der Spermienkonzentration und --motilität und ggfs. Morphologie. Optional: beheizbarer Objektträgertisch

Zentrifuge zur Bearbeitung von Ejakulat und Urin: Für die ART-Therapien ausreichend. Für die Diagnostik können höhere Zentrifugalgeschwindigkeiten notwendig sein (s. WHO-Handbuch 5. Auflage, 2010)

Mikropipetten: Ausreichender Pipettensatz je nach Bedarf. Verwendung von Einmalpipetten oder Einmal-Filterspitzen für alle Arbeitsschritte

Kühlschrank/Gefrierschrank: Kann auch im ART-Bereich oder in einem benachbarten Raum stehen

Zählkammern: Dem Arbeitsaufkommen gemäß in angepasster Zahl

Laborzählgerät: Optional

Verschlussichere Entsorgungsbehälter: Für scharfe und spitze Objekte und gefährlichen/infektiösen Abfall, entsprechend den jeweiligen Bestimmungen zur Abfallentsorgung

Ausstattung zur Kryokonservierung von Ejakulat, -Nebenhodenpunktat und Hodenbiopsien: Der angewandten Methode entsprechend, kann das Gerät im ART- oder Kryo--Labor stehen. Siehe unter 3.2.3. Kryolager

3.2.2. Bereich für die In-vitro-Kultur

Gegenstand und Bemerkungen

Inkubatoren in angemessener Zahl, CO₂-begast: Mindestens 2 für die In-vitro-Kultur geeignete Inkubatoren

Wärmeschrank unbegast: Optional

Unterbrechungsfreie Stromversorgung bzw. Notstromversorgung: Für Inkubatoren mit In-vitro-Kulturen, ggfs. für Kryogerät

Alarmweiterleitungssystem: Für Inkubatoren mit In-vitro-Kulturen und für Kryolagerungsbehälter

ICSI-Arbeitsplatz: Invers-Mikroskop mit Modulations- oder Interferenzoptik mit beheizbarem Objektisch, mit geeigneten Mikromanipulatoren und Mikroinjektoren auf schwingungsarmem Arbeitsplatz

Zoom-Stereomikroskop: Mit Wärmeplatte (möglichst integriert in Arbeitsplatz)

Wärmesystem: Zur Wahrung der Temperaturkonstanz bei allen Arbeitsschritten

pH-Meter und/oder CO₂-Messgerät oder Blutgasanalysegerät: Zur Funktionskontrolle der Inkubatoren bzw. der Kulturmedien

Thermometer bzw. Min-Max-Thermometer: Zur Temperaturkontrolle von Inkubatoren, Wärmeplatten, Kühlschrank

Kühlschrank/ Gefrierschrank: Vorratshaltung von Medien etc.

Mikropipetten: Ausreichender Pipettensatz je nach Bedarf. Verwendung von Einmalpipetten oder Einmal-Filterspitzen für alle Arbeitsschritte

Entsorgungsbehälter: Entsprechend den jeweiligen Bestimmungen zur Abfallentsorgung

3.2.3. Bereich für die Kryolagerung

Gegenstand und Bemerkungen

Kryogerät und/oder Vitrifikationssystem für alle potentiell einzufrierenden Zellen/Gewebe: Der angewandten Methode entsprechend (z. B. geeignet zum programmgesteuerten Einfrieren) jeweils mit dem Probensystem zugehörigen Zubehör (ggfs. spezielles Dewar-Gefäß, Styroporgefäße, Scheren, Pinzetten, Schweißgeräte). Die -Vitrifikation kann sowohl im offenen als auch geschlossenem System erfolgen.

Etikettendrucker: Zur Kennzeichnung der Kryoproben (Stickstoff-stabil)

Handhabungssystem: Zum Umlagern der Kryogefäße in die Lagerbehälter

Transportgefäß: Transport von Kryoproben; nicht notwendig, wenn Transportgefäß vom durchführenden externen Transportunternehmen zur Verfügung gestellt wird

Lagerbehälter: Mit Einordnungssystemen. Mit Überwachungssystem (Temperatur oder Füllstandkontrolle) und Alarmweiterleitung

Quarantäne-Lagerbehälter: Notwendig, sobald Proben mit unklarer Serologie bearbeitet werden

Stickstoffversorgungsbehälter: Größe dem Stickstoffverbrauch entsprechend, mit Entnahmeheber und/oder mit Lagerbehälter verbunden

Schutzausrüstung: Brillen, Handschuhe, Schürze

3.2.4. Gasversorgung

Eine unterbrechungsfreie Gasversorgung der Brutschränke ist sicherzustellen. Die Räumlichkeiten für die Aufstellung der Gasflaschen sind von außen gut zugänglich und räumlich vom ART-Labor getrennt.

Gegenstand und Bemerkungen

Gaszufuhr-Anlage: Zur Sicherung der kontinuierlichen Gasversorgung der Inkubatoren.

Kohlendioxid-Gas (CO₂): Gasqualität: Medizinische Qualität empfohlen

Stickstoff (N₂ fakultativ): Gasqualität: Pharmaqualität empfohlen

Mischgas (fakultativ): Die Einzelkomponenten erfüllen die Qualitätsanforderungen für Pharmagase.

Zur Verwendung von Gasen siehe [22, 23].

3.2.5. Administration: ART-Labor Büro

Gegenstand und Bemerkungen

PC: Bedarfsgerechte Anzahl zur Dokumentation, Gerätesteuerung und -überwachung.

Drucker: z. B. Papierdrucker, Etikettendrucker, Barcodedrucker

Ordnungssysteme und Stellplatz für Dokumente in Papierform: z. B. Laborprotokolle, Gerätebücher etc.

3.3. Kryolagerung von Keimzellen, Vorkernstadien und Embryonen

Für die Lagerung von Keimzellen, Vorkernstadien und Embryonen muss ausreichend Kapazität vorhanden sein.

Das Lagersystem muss jederzeit die Auffindbarkeit der Proben gewährleisten. Die geeigneten Lagerbedingungen sind durch regelmäßige Funktionskontrollen (z. B. Füllstandkontrolle, Temperaturkontrolle) zu gewährleisten.

Werden Proben mit noch unbekanntem Infektionsparametern kryokonserviert und/oder gelagert, sind diese als „Material in Quarantäne“ zu kennzeichnen (siehe auch Leitlinie zum verantwortlichen Arbeiten im ART-Labor) und getrennt zu lagern.

Das Kryolager ist gegenüber unbefugtem Zutritt zu sichern.

3.4. Kultivierungsmedien und -Materialien

Kultivierungsmedien und Materialien sollten für die In-vitro-Kultur humaner Keimzellen und Embryonen bestimmt sein und geltende Qualitätsanforderungen erfüllen (CE-Zulassung, Medizinprodukt). Sind Materialien, die diese Anforderungen erfüllen, nicht verfügbar, kann eine Alternative mit vergleichbaren Anforderungen (z. B. Tissue Culture, In-vitro-Culture) gewählt werden.

Kulturmedien und Materialien müssen entsprechend den Herstellerangaben transportiert und gelagert werden. Bei Anbruch müssen Medien mindestens mit dem Anbruchsdatum beschriftet werden.

Die Chargen der verwendeten Medien und Materialien, die direkt oder indirekt in Kontakt mit den Keimzellen kommen, sind zu dokumentieren und dem Patienten(paar) zuzuordnen.

4. Hygiene und Reinigung

Gemäß §6 AMWHV müssen die Hygienemaßnahmen geeignet sein, die für seine Verwendung erforderlichen Eigenschaften des Gewebes zu schützen, und das Risiko einer Verunreinigung, insbesondere einer mikrobiellen Verunreinigung, während der Be- oder Verarbeitung zu minimieren.

Für Keimzellen besteht kein hohes Risiko der Verunreinigung. Keimzellen kommen aus nicht-sterilen Bereichen des Körpers und werden nach der In-vitro--Fertilisation wieder in den Uterus, der ebenfalls nicht steril ist, transferiert. Gemäß §36 der AMWHV müssen die Hygienemaßnahmen geeignet sein, die Qualität und Sicherheit der Gewebe zu erhalten. Das bedeutet, dass die Hygienemaßnahmen den Geweben nicht schaden dürfen. Daher sollte auf die Verwendung Alkohol-basierter Desinfektionsmittel verzichtet werden. Desinfektionsmittel auf Basis quartärer Ammoniumverbindungen sollten nur nach Bedarf eingesetzt werden (siehe unten), da auch sie flüchtige Komponenten (VOCs: volatile -organic compounds) enthalten. Reproduktive Zellen werden durch flüchtige organische Verbindungen in der Umgebungsluft in ihrer Entwicklung negativ beeinträchtigt. Damit stellen Desinfektionsmittel grundsätzlich ein Risiko für die Qualität und Sicherheit der Gameten und Embryonen in vitro dar [24]. Es gibt keine Substanzklasse bei den Desinfektionsmitteln, die als sicher für Keimzellen gelten kann. Der Hygieneplan für das IVF-Labor sollte sicherstellen, dass der negative Einfluss von Desinfektionsmitteln auf Gameten und Embryonen minimiert wird.

§ 6 der AMWHV fordert die Erstellung eines Hygieneplans. Die Hygiene-maßnahmen sind gemäß diesem Plan durchzuführen und entsprechend zu dokumentieren.

Auf den Einsatz leicht flüchtiger Desinfektionsmittel auf Basis von Alkoholen sollte im ART-Labor verzichtet werden.

Im Labor sollte die Desinfektion nicht prophylaktisch erfolgen, sondern nur bei Bedarf, zum Beispiel bei einer Kontamination mit Follikelflüssigkeit oder Ejakulat.

Während der Arbeiten an den aufbereiteten Zellen sollte auf eine Des-infektion ganz verzichtet werden.

In den angrenzenden Räumlichkeiten des ART-Labors sollte der Einsatz von Desinfektionsmitteln auf das Notwendigste begrenzt werden.

Die Wirksamkeit der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sollte regelmäßig z. B. durch Abklatschproben oder Sedimentationsplatten, überprüft werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Association of Clinical Embryologists. Guidelines on Good Practice in Clinical Embryology Laboratories. Hum Fert 2012; 15: 174–89.
2. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Recommended practices for the management of embryology, andrology, and endocrinology laboratories: a committee opinion. Fertil Steril 2014; 102: 960–3.
3. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos M, Apter S, Coticchio G, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. Hum Reprod 2015; 31: 685–6.
4. Baukloh V, Hilland U. Richtlinien 2004/23/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates; Reproduktions-mezizin. J Reproduktionsmed Endokrinol 2005; 5: 344–7.

5. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online* 2017; 35: 494–510.
6. Bundesärztekammer. Richtlinie zur Entnahme und Übertragung von menschlichen Keimzellen im Rahmen der assistierten Reproduktion. *Deutsches Ärzteblatt*. DOI: 10.3238/arztebl.2018.Rili_assReproduktion_2018.
https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/Ass-Reproduktion_Richtlinie.pdf (zuletzt gesehen 01.06.2021).
7. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Revised minimum standards for practices offering assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2008; 90 (5 Suppl): S165–8.
8. Keck C, Fischer R, Baukloh V, et al. Staff management in the in vitro fertilization laboratory. *Fertil Steril* 2005; 84: 1786–8.
9. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 2017; 87: 1441–74.
10. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update* 2016; 22: 2–22.
11. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 434–42.
12. Swain JE, Cabrera L, Xu X, et al. Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 142–7.
13. Gardner DK, Kelley RL. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. *J Dev Orig Health Dis* 2017; 8: 418–35.
14. Swain JE. Controversies in ART: can the IVF laboratory influence preimplantation embryo aneuploidy? *Reprod Biomed Online* 2019; 39: 599–607.
15. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod* 2001; 16: 2374–8.
16. Chatzimiletiu K, Morrison EE, Panagiotidis Y, et al. Cytoskeletal analysis of human blastocysts by confocal scanning microscopy following vitrification. *Hum Reprod* 2012; 27: 106–13.
17. ESHRE Working Group on Ultrasound in ART, D'Angelo A, Panayotidis C, Amso N, et al. Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up. *Hum Reprod Open* 2019; (4): hoz025.
18. Krause W, Weidner W. Nachweis von Bakterien im Ejakulat. *Andrologia* 1982; 14: 284–6.
19. Jue JS, Ramasany R. Significance of positive semen culture in relation to male infertility and the assisted reproductive technology process. *Trans Androl Urol* 2018; 6: 916–22.
20. Kastrop PM, de Graaf-Miltenburg LA, Gutknecht DR, et al. Microbial contaminations of embryo cultures in an ART Laboratory: sources and management. *Hum Reprod* 2007; 22: 2243–8.

21. Peric A, Weiss J, Vulliemoz N, et al. Bacterial colonization of the femal upper genital tract. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3405.

22. Akerlindh K. Richtlinien und Vorschriften für den Einsatz von Gasen in der pharmazeutischen Produktion. 2008. Retrieved from <https://www.pharma-food.de/richtlinien-und-vorschriften-fuer-den-einsatz-von-gasen-in-der-pharmazeutischen-produktion/> (zuletzt gesehen 01.06.2021).

23. Brandes R. Pharmazeutische Gase – ein Überblick. 2005. Retrieved from <https://www.gmp-verlag.de/de/leitartikel-gmp-logfile/gmp-aktuell/gmp-logfile-06-pharmazeutische-gase.html?layout=print> (zuletzt gesehen 01.06.2021).

24. Melin V, Potineni H, Hunt P, et al. Exposure to common quaternary ammonium disinfectants decreases fertility in mice. *Reprod Toxicol* 2014; 50: 163–70.

Weiterführende Literatur:

- Hughes C. Association of clinical embryologists – guidelines on good practice in clinical embryology laboratories 2012. *Hum Fertil* 2012; 15: 174–89.

- Kovacic B, Plas C, Woodward B, et al. The educational and professional status of clinical embryology and clinical embryologists in Europe. *Hum Reprod* 2005; 30: 1755–62.

- Mortimer D, Cohen J, Mortimer S, et al. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2018; 36: 658–74